

香石竹叶片离体再生体系的建立

陈英¹, 王光萍¹, 诸葛强¹, 蔡有铭², 黄敏仁¹, 王明麻¹

(1. 南京林业大学林木遗传和基因工程实验室, 江苏 南京 210037; 2. 上海市农业委员会, 上海 200001)

摘要: 以香石竹(*Dianthus caryophyllus* Linn.) 无菌苗叶片为外植体, 从不同细胞分裂素及其他激素配合使用等方面进行筛选, 建立香石竹叶片离体再生体系。结果表明, 不同的细胞分裂素影响叶片不定芽分化频率, 其中较低浓度的 6-BA(0.5 mg · L⁻¹) 和 TDZ(0.001 mg · L⁻¹) 配合使用能有效诱导香石竹叶片不定芽分化; 添加一定浓度的 PP₃₃₃(4 mg · L⁻¹) 可提高叶片不定芽分化频率和平均芽数。香石竹叶片不定芽分化的适宜培养基为: MS + 0.002 mg · L⁻¹ TDZ + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg · L⁻¹ IAA + 4 mg · L⁻¹ PP₃₃₃; 壮苗培养基为: MS + 0.2 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg · L⁻¹ IAA; 生根培养基为: 1/2 MS。不定芽诱导频率达到 42.61%, 平均芽数为 4.53 个。

关键词: 香石竹; 叶片; 不定芽分化; 再生体系

中图分类号: Q949.745.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2005)01-0016-04

Establishment of regeneration system from leaf explant of *Dianthus caryophyllus* CHEN Ying¹, WANG Guang-ping¹, ZHUGE Qiang¹, CAI You-ming², HUANG Min-ren¹, WANG Ming-xiu¹ (1. The Laboratory of Forest Genetics and Gene Engineering of Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Shanghai Agriculture Committee, Shanghai 200001, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2005, 14(1): 16-19

Abstract: The regeneration system from leaf of *Dianthus caryophyllus* Linn. was established by using different cytokinins combining with other phytohormones. The results showed that the kinds of cytokinin effected the differentiation rate of adventitious buds from leaf; 6-BA and TDZ in relatively low concentration can induce differentiation of adventitious buds from leaf and PP₃₃₃ can increase the differentiation rate and the number of adventitious buds. The system of plant regeneration from leaf of *D. caryophyllus* consisted of: MS + 0.002 mg · L⁻¹ TDZ + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg · L⁻¹ IAA + 4 mg · L⁻¹ PP₃₃₃ for the differentiation of adventitious buds, MS + 0.2 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg · L⁻¹ IAA for the growth of adventitious buds and 1/2 MS for the rooting of adventitious buds. The differentiation rate of adventitious buds is 42.61% and the average number of adventitious bud is 4.53.

Key words: *Dianthus caryophyllus* Linn.; leaf; differentiation of adventitious bud; regeneration system

香石竹(*Dianthus caryophyllus* Linn.) 又名康乃馨, 是世界四大切花之一。中国香石竹栽培开始于 20 世纪初, 经过 20 多年的发展, 中国已成为世界第二大香石竹切花生产国, 目前香石竹品种主要从荷兰、以色列、德国、法国引进母本苗, 但生产成本很高, 因此, 尽快培育具有自主知识产权的新品种是亟待解决的问题。传统的花卉育种具有周期长、工作量大和自然变异频率低、杂交不亲和等局限性。近年发展起来的基因工程为花卉新品种培育提供了广阔的前景和全新的思路, 它可以通过分子水平上的操作而直接改变花卉的重要性状, 从而大大缩短花卉育种周期, 极大地提高花卉的品质。但成功的基

因转化首先依赖于良好的植物转基因受体系统的建立。所谓植物转基因受体系统^[1], 是指用于转化的外植体通过组织培养途径, 能高效、稳定地再生植株, 并能接受外源 DNA 整合, 转化选择抗生素敏感的再生系统。作者通过建立香石竹高效再生体系, 以期开展香石竹转基因研究和品种选育提供技术基础。

收稿日期: 2004-07-30

基金项目: 国家转基因专项(JY-B-29-02)资助项目

作者简介: 陈英(1973-), 女, 四川宜宾人, 博士, 讲师, 主要从事林木基因工程研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本实验室保存的香石竹无菌苗以根部萌蘖芽方式组培繁殖。用镊子轻轻撕下约3周龄的试管苗顶芽下幼嫩、平展的3对叶片,带叶柄基部平放于分化培养基上,培养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照强度4000 lx,每天光照时间16 h^[2]。

基本培养基为MS。分化培养基中含 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂,附加的各种生长素、细胞分裂素均经过滤灭菌,pH 5.8。生根培养基为1/2 MS,添加 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂,pH 5.8。

1.2 方法

用4种细胞分裂素: $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-ip, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT对香石竹叶片进行不定芽诱导。在基本培养基中附加 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA,并添加不同浓度6-BA(0.0 、 0.5 、 1.0 、 2.0 和 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),分析6-BA对香石竹叶片不定芽分化影响。将不同细胞分裂素配合使用,确定香石竹叶片不定芽分化的最适细胞分裂素配比,采用以下4种处理: $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ; $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.002 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-ip; $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT; $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT。在培养基中添加一定浓度多效唑(PP₃₃₃),适当增加TDZ浓度,提高香石竹不定芽诱导频率和降低玻璃化芽发生。

1.3 数据统计

叶片在分化培养基上培养40 d后,统计分化频率和平均分化芽数。分化频率(%) = (分化不定芽的外植体数 ÷ 接种外植体数) × 100%; 平均分化芽数 = 分化不定芽的总数 ÷ 不定芽分化的外植体数。每种处理统计64个外植体,计算平均值。

2 结果和分析

2.1 不同的细胞分裂素对香石竹叶片不定芽分化的影响

植物组织培养中,细胞分裂素对外植体的分化起着重要作用。根据相关文献,香石竹快繁主要采用6-BA,且浓度多在 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间^[2-5]。ZT和KT对香石竹分化也有一定的作用,使用浓度

在 $0.5 \sim 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,且浓度在 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时较好^[6,7]。此外,研究表明较低浓度($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的2-ip对许多植物叶片诱导不定芽的分化作用显著。为此,对不同细胞分裂素对香石竹叶片不定芽分化的影响进行了分析,结果见表1。

研究结果表明,4种细胞分裂素对香石竹叶片不定芽诱导均有一定作用:在添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA的培养基中,不定芽的诱导频率为25%,平均分化芽数为1.92个;在添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-ip、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT的培养基中,不定芽的诱导频率分别为20.82%、4.17%和16.67%,平均分化芽数分别为1.50、1.50和1.63个。其中6-BA对香石竹不定芽诱导效果较其他3种细胞分裂素好,故以后实验采用6-BA。

表1 4种细胞分裂素对香石竹叶片不定芽分化的影响
Table 1 Effects of four kinds of cytokinin on differentiation of adventitious bud of *Dianthus caryophyllus* Linn.

细胞分裂素 Cytokinin	浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration	分化频率/% Differentiation rate	平均芽数 Average number of bud
6-BA	1.0	25.00	1.92
2-ip	0.1	20.83	1.50
ZT	1.0	4.17	1.50
KT	1.0	16.67	1.63

2.2 6-BA对叶片不定芽分化的影响

不同浓度6-BA对香石竹叶片不定芽分化的影响见图1。当6-BA浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时叶片的不定芽分化频率最高,为达19.44%,但平均分化芽数仅为1.29个,且玻璃化比较严重,得到的正常芽较少。而在 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA处理中,不定芽分化频率最高,达19.05%,平均分化芽数也有2.33个,正常芽也相对较多,不定芽诱导效

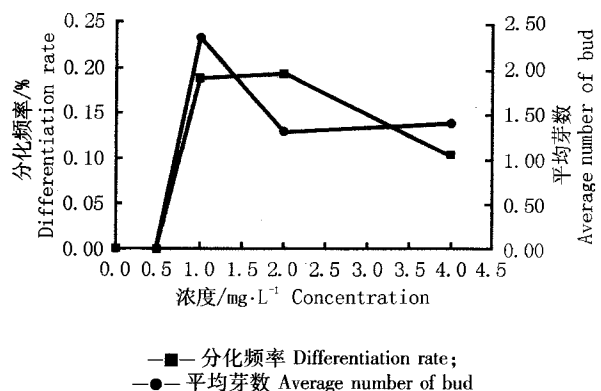


图1 6-BA对香石竹叶片不定芽分化的影响
Fig. 1 Effect of 6-BA on differentiation of adventitious bud of *Dianthus caryophyllus* Linn.

果较好于其他浓度。

2.3 不同的细胞分裂素配合使用对香石竹叶片不定芽分化的影响

从表1和图1可以看出,6-BA虽然对香石竹不定芽诱导效果较2-ip、KT和ZT好,但最高分化率也仅为20%左右,并且当6-BA浓度高于 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,分化频率反而有所下降,玻璃化现象严重。为此,研究了不同的细胞分裂素配合使用对香石竹叶片不定芽分化的影响,结果见表2。

表2 不同的细胞分裂素配合使用对香石竹叶片不定芽分化的影响
Table 2 Effects of different cytokinin combination on differentiation of adventitious bud of *Dianthus caryophyllus* Linn.

浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Concentration	分化频率/%	平均芽数
6-BA	Cytokinin	Differentiation rate	Average number of bud
0.5	TDZ 0.001	37.50	2.11
0.5	2-ip 0.002	35.42	2.35
0.5	KT 0.5	4.17	1.00
0.5	ZT 0.5	18.75	2.33

实验结果表明, $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA与 $0.001\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ和 $0.002\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-ip配合使用诱导频率和平均芽数均好于其他2种处理,叶片不定芽诱导频率较单一使用6-BA提高50%以上,玻璃化芽也相对减少,说明2种细胞分裂素配合使用能使不定芽的诱导频率有所提高。

2.4 多效唑对香石竹叶片不定芽分化的影响

多效唑 PP_{333} 是英国ICI公司在20世纪70年代末推出的一种高效、低毒的植物生长延缓剂。对许多植物的研究表明,培养基中添加适当浓度的多效唑,能提高组织分化率和绿苗形成率,有效地提高分化苗的素质和再生苗形成率^[8-10]。为了进一步提高香石竹叶片不定芽诱导频率和降低玻璃化芽发生,

在培养基中添加了一定浓度的多效唑,并适当增加了TDZ的使用浓度,结果见表3。

据报道,经多效唑处理后的一些植物的愈伤组织内过氧化物酶活性和吲哚乙酸氧化酶活性均显著提高。这2种酶可分解IAA,使其含量下降。植物体内较高的细胞分裂素/生长素比例有利于芽的分化。本试验结果表明,添加多效唑有利于提高平均芽数;TDZ浓度的提高也使不定芽诱导频率有一定的增加。综合2项指标,确定 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.002\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ + $0.02\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA + $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PP₃₃₃为较优化的香石竹再生培养条件,叶片不定芽的诱导频率达42.61%,平均芽数为4.53个(图2)。

表3 多效唑对香石竹叶片不定芽分化的影响
Table 3 Effect of PP₃₃₃ on differentiation of adventitious bud of *Dianthus caryophyllus* Linn.

浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Concentration	分化频率/%	平均芽数		
6-BA	TDZ	IAA	PP ₃₃₃	Differentiation rate	Average number of bud
0.5	0.001	0.2	0	37.50	2.11
0.5	0.001	0.2	2	39.06	3.28
0.5	0.001	0.2	4	21.88	2.14
0.5	0.002	0.2	2	28.13	1.94
0.5	0.002	0.2	4	42.61	4.53
0.5	0.005	0.2	2	45.83	3.09

2.5 壮苗与生根

将诱导形成的丛生芽转入壮苗培养基(MS + $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA)2周左右可长至2.0~3.0 cm高,再将芽切下转入1/2 MS培养基生根,基部切口处形成愈伤组织,10余天后在愈伤组织周围长出根,生根率可达80%~100%。



a. 不定芽分化培养基 Culture medium for differentiation of adventitious bud; b. 壮苗培养基 Culture medium for growth; c. 生根培养基 Culture medium for rooting

图2 香石竹叶片离体再生体系的建立
Fig. 2 The regeneration system from leaf of *Dianthus caryophyllus* Linn.

3 讨 论

1) 不同细胞分裂素作用机理各异,因此有许多报道表明不同的细胞分裂素配合使用比单独使用效果好^[11,12]。TDZ 是苯基脲衍生物^[13],可引起一些特殊的生理现象如促进乙烯的产生、扁化现象等^[14],并可能具有促使植物体内非结合态 IAA 保持在高水平的功能等^[15],从而促进芽的分化与生长。本实验结果表明,添加 TDZ 在一定程度上提高了不定芽诱导频率。

2) 在香石竹组织培养中常产生玻璃苗,特别是细胞分裂素浓度较高时,玻璃化十分严重。早在 20 世纪 60 年代,Phillips 和 Hacket 等^[16,17]描述了石竹 (*Dianthus chinensis* Linn.) 茎尖培养时所出现的半透明的异常试管苗现象。Debergh^[18]等在系统研究的基础上,于 1981 年首先提出了试管植物“玻璃化作用”的概念。大多数实验结果表明玻璃化的形成与培养瓶内的水分、营养及激素有关,但目前仍未找到行之有效的解决方法^[19]。有实验证明,经多效唑处理后的大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.]、水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 和苦荞 [*Fagopyrum tatarium* (Linn.) Caern.] 等作物的叶绿素含量、光合强度增加^[8]。因此光合产物增多及激素类物质的平衡,可能是多效唑能抑制试管苗玻璃化、改善再生苗的原因。

本实验结果说明,添加多效唑不仅有利于提高平均芽数,也降低了玻璃化芽的发生率。

3) 由于植物基因转化的频率较低,一般情况下只有 0.1% 的转化率,而且在植物基因转化操作中的一些处理,如农杆菌的侵染、使用抗生素对转化体进行筛选和继代培养等都会使转化外植体比非转化外植体的再生频率有不同程度的降低,有的甚至不能分化或只能分化形成芽,但难以形成正常植株。因此,转基因受体系统必须具有高频的转化率及较强的再生能力。本实验建立的香石竹再生体系不定芽诱导频率为 42.61%,平均芽数为 4.53 个,是较为适宜的香石竹叶片离体再生体系。

参考文献:

[1] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社,

- 2002.
- [2] 林荣呈,包满珠. 香石竹的叶片培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(3): 205-206.
- [3] 周丹丽. 香石竹的茎尖培养及快速繁殖[J]. 西南园艺, 2001, 29(3): 41.
- [4] 张卫芳,段新玲,段黄金,等. 香石竹组织培养快速繁殖技术初探[J]. 塔里木农垦大学学报, 2000, 12(2): 28-30.
- [5] 杨丽莉,贾伟珑. 锥花丝石竹快速繁殖参数的探讨[J]. 山西大学学报(自然科学版), 1999(2): 169-173.
- [6] 刘幼琪,万永红,陈冬玲,等. 丝石竹花外植体诱导丛生芽的研究[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2001, 23(3): 269-272.
- [7] Thimann K V, Laloraga M M. Changes in nitrogen in pea stem sections under the action of kinetin[J]. *Physiol. Plant*, 1960, 13(1): 165-170.
- [8] 李明军. 多效唑——一种优良的植物生长调节剂[J]. 植物学通报, 1995, 12(2): 27-31.
- [9] 蒋泽平,刘根林,倪竞德. 多效唑及光温条件对丝石竹试管苗生长的影响[J]. 江苏林业科技, 2000, 27(5): 29-31.
- [10] Li Wen-ze, Jiang Jian-kang, Hu Han. The effects of genotype, MET, PP₃₃₃ and mannitol pretreatment on barley anther culture [A]. You C B, Chen I. *Agricultural Biotechnology* [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1992.
- [11] 王关林,方宏筠,那杰. 高活性细胞激动素 TDZ 在植物组织培养中的应用[J]. 植物学通报, 1997, 14(3): 47-53.
- [12] 诸葛强,王婕琛,黄敏仁,等. 新疆杨植株再生受体系统的建立[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2003, 27(6): 1-4.
- [13] 杨业正. 棉花脱叶剂 TDZ 简介[J]. 植物生理学通讯, 1989, 25(6): 63-64.
- [14] 徐华松,徐九龙,黄学林. TDZ 在植物组织培养中的作用[J]. 广西植物, 1996, 16(1): 77-80.
- [15] 张志宏,景士西,王关林. TDZ 对苹果叶片离体再生不定芽的效应[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(6): 420-423.
- [16] Phillips DJ, Matthews GJ. Growth and development of carnation shoot tips *in vitro* [J]. *Bot Gaz*, 1964, 125(1): 7-12.
- [17] Hacket W P, Anderson J M. Aseptic multiplication and maintenance of differential carnation shoot tissue derived from shoot apices [J]. *Proc Amer Soc Hort Sci*, 1967, 90(2): 365-369.
- [18] Debergh PC. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential [J]. *Physiol Plant*, 1981, 53(1): 181-187.
- [19] 梁海曼,周菊华. 试管苗玻璃化现象的生理生化和机理探讨[J]. 武汉植物学研究, 1994, 12(3): 281-288.

(责任编辑:张垂胜)